

Production de protéines d'organismes unicellulaires à partir de pâtes de neutralisation d'origine industrielle

D. MONTET (1), R. RATOMAHENINA (1), J. M. LABORBE (1), M. PINA (2), J. GRAILLE (2) et P. GALZY (1)

Résumé. — Les soapstocks sont un sous-produit du raffinage chimique des corps gras. Généralement, ils sont utilisés dans l'industrie des savons ou comme source d'acides gras pour l'oléochimie. Il est proposé leur bio-conversion en protéines d'organismes unicellulaires pour l'alimentation animale et aussi pour l'alimentation humaine. Un criblage de différentes levures a été effectué et 5 souches ont été sélectionnées pour leur vitesse de croissance, leur rendement élevé et pour leur haute teneur en protéines. Quelques caractéristiques analytiques de ces levures sont données.

INTRODUCTION

Les pâtes de neutralisation sont un sous-produit important des industries du raffinage des corps gras. Elles sont utilisées principalement dans les industries du savon, de la peinture, de la lipochimie où elles subissent la concurrence des détergents synthétiques. Peu d'études de valorisation de ces pâtes ont été réalisées par le biais de la microbiologie. Ba *et al.* [1, 2] ont fait pousser des levures sur huiles d'arachide obtenues par traitement de ces pâtes. Martinet *et al.* [3, 4] ont donné une utilisation du concret de palme en le faisant consommer à des levures sous forme de savons d'ammonium. Montet *et al.* [5] ont utilisé comme substrat de croissance de levures, des glycérides d'origine diverses. Hottinger *et al.* [6, 7] ainsi que Green *et al.* [8] ont fait pousser *Geotrichum candidum* et *Candida lipolytica* sur des huiles de poissons afin de produire des protéines d'organismes unicellulaires.

Le but de ce travail est de choisir une souche de levure, capable de pousser avec de forts rendements sur des pâtes de neutralisation d'origine industrielle.

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les souches étudiées proviennent du Centraal Bureau voor Scimmelcultuur (CBS). Elles ont été choisies pour leur forte activité lipasique [Montet *et al.*, 5] : *Candida curvata* CBS 570, *Candida rugosa* CBS 613, *Geotrichum candidum* CBS 178.53, *Rhodotorula pilimanae* CBS 5804, *Candida lipolytica* YB 423.12.

Conditions de culture.

Pour la production de biomasse, le milieu utilisé est un milieu minéral, dont la composition est : MgSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$

(0,068 g/l) ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,165 g/l) et $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0,165 g/l). Le pH est ajusté à pH 6,5 avec des solutions concentrées de H_2SO_4 après ajout de pâtes de neutralisation à la concentration de 0,3 %.

Pour l'étude de l'influence des vitamines ou des oligoéléments, les cultures sont réalisées sur le même milieu, additionné de 5 ml/l de la solution I, ou de 1 ml de la solution II, dont les compositions sont les suivantes :

Solution I : pantothénate de calcium 80 mg, thiamine 80 mg, inositol 80 mg, pyridoxine 80 mg, acide nicotinique 20 mg, biotine 0,8 mg, le tout dans 200 ml.

Solution II : acide borique 0,5 mg, sulfate de cuivre 0,4 mg, iodure de potassium 0,1 mg, sulfate de manganèse 0,4 mg, molybdate de sodium 0,2 mg, sulfate de zinc 0,4 mg, le tout dans 200 ml d'eau.

Les cultures sont réalisées dans une chambre régulée à 28 °C dans des erlenmeyers remplis au 1/10^e de leur volume et agités (80 oscillations/min, amplitude 7,5 cm) pour assurer une aération convenable.

Méthodes analytiques.

L'étude de la vitesse et des rendements de croissance a été réalisée selon la méthode mise au point par Martinet *et al.* [3].

L'analyse des savons a été réalisée selon la technique utilisée par Ba *et al.* [1, 2].

La teneur en protéines des cellules a été déterminée selon la méthode de Strickland [9].

Les acides aminés ont été analysés après hydrolyse acide de l'échantillon (HCl : 6N) pendant 24 h dans un four à 100 °C. L'hydrolysate a été filtré et évaporé sous pression réduite dans un bain-marie à 35 °C. Le résidu final a été repris dans un tampon citrate (pH 2,2) et 20 μl de cette solution sont injectés dans un appareil Durrum D500 pour déterminer le spectre en acides aminés par HPLC sur une résine échangeuse d'ions.

L'extraction à l'hexane des levures a été déterminée selon la méthode normalisée Afnor n° NF-V03-905, légèrement modifiée dans la mesure où nous avons parfois dis-

(1) INRA-ENSA, Chaire de Génétique et de Microbiologie, Place Viala, 34060 Montpellier Cedex (France).

(2) IRHO-CIRAD, Division Chimie des Corps Gras, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex (France).

posé de moins de 10 g de levures et que seule la première extraction de 4 h a été effectuée.

La composition en acides gras a été déterminée après transformation en esters méthyliques [2] par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire en verre préparée en laboratoire avec du Carbowax 20 M comme phase stationnaire selon la méthode de Grob *et al.* [10].

Les métaux ont été dosés par spectrométrie de flamme.

Les acides nucléiques ont été dosés comme suit :

— la teneur en ADN et ARN est déterminée après extraction des acides nucléiques totaux par le phénol selon la technique de Monier adaptée à la levure par Weill *et al.* [11] ;

— l'ADN seul a été dosé selon la technique de Burton [14] qui consiste à doser par la diphenylamine sulfurique le désoxyribose libéré par l'hydrolyse du DNA ;

— l'ARN a été dosé par la méthode dite au phloroglucinol de Euler et Hann améliorée par Privat de Garihle [13].

II. — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

1. — Recherche d'un milieu de culture.

La croissance des 5 souches étudiées ici a été testée sur différents milieux de culture. Les résultats sont donnés dans le tableau I où les temps de génération sont exprimés en heures.

Ces résultats montrent qu'à l'exception de *C. curvata* et *R. pilimanae*, toutes les souches poussent sur le milieu de base MB. Un faible apport de sulfate d'ammonium favorise la croissance de ces souches aux deux pH d'étude (6,5 et 3,5). L'étude de la croissance sur des milieux plus com-

plets fait apparaître que deux souches, *C. curvata* et *C. rugosa*, ont besoin de vitamines.

Les trois autres souches ont plus d'intérêt puisqu'elles présentent des temps de génération inchangés, que ce soit avec additifs ou sans additifs. Pour ces souches, le milieu de base suffit à fournir tous les éléments nécessaires à la croissance. Du fait que tous ces microorganismes ont théoriquement besoin de thiamine pour se développer, il est donc probable que les pâtes de neutralisation en contiennent puisque la croissance se déroule sans problème sur ce substrat. Le pH 3,5 affecte toutes les levures à l'exception de *G. candidum* qui pousse mieux à pH 3,5 qu'à pH 6,5.

2. — Étude des rendements de croissance.

Les rendements de croissance ont été effectués pour les 5 souches sur le milieu suivant : pâte de neutralisation 0,1 % (P/V), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,068 g/l), $\text{HPO}_4 (\text{NH}_4)_2$ (0,165 g/l) dont le pH est ajusté à 6,5 avec de l'acide sulfurique.

Les rendements obtenus (rendements en protéines, rendements en matière sèche) sont donnés dans le tableau II. Ils sont exprimés en fonction du substrat consommé.

Les rendements en matière sèche sont très élevés comme le laissait prévoir les résultats antérieurs obtenus sur savons d'ammonium [Martinet *et al.*, 3,4].

3. — Composition des cellules de levures.

a) Composition en acides aminés.

Après croissance sur pâtes de neutralisation (0,1 %), la composition en acides aminés des levures a été déterminée. Le tableau III montre que toutes les souches sont riches en lysine (en moyenne 8 %) et peuvent être considérées comme étant une bonne source de protéines non conventionnelles.

b) Composition en lipides totaux.

La composition des cellules en lipides totaux (lipides/matière sèche) et leur spectre en acides gras a été déterminée après croissance sur pâte de neutralisation. Les résultats sont donnés dans le tableau IV où nous remarquons que la composition en acides gras des levures rappelle la composition du substrat lipidique sur lequel elles ont poussé. Ce phénomène est très important car la nature du substrat pourrait conditionner la qualité de la levure aliment, en fonction de sa teneur en acides gras particuliers.

Le tableau IV montre que les lipides de *C. lipolytica*, *C. rugosa* et *G. candidum* sont plus insaturés que les pâtes de neutralisation de départ.

De même, il faut noter que les C22 et C24, présents en faible quantité dans les pâtes de neutralisation, ne se retrouvent pas dans les levures. Il semble par ailleurs que les C20 et C20 : 1 ne soient présents en quantité notable que chez *R. pilimanae*.

c) Teneur des cellules en divers métaux.

La teneur en métaux et en phosphore des cellules ayant poussé sur pâtes de neutralisation a été déterminée et comparée aux teneurs initiales du substrat. Les résultats sont donnés dans le tableau V où aucune anomalie n'est discernée.

d) Teneur des cellules en acides nucléiques.

Les résultats de cette détermination sont donnés dans le tableau VI.

TABLEAU I. — Comparaison de la vitesse de croissance de cinq souches de levures sur milieux à base de pâte de neutralisation.

Aditifs	Souches	<i>Candida curvata</i> CBS 570	<i>Rhodotorula pilimanae</i> CBS 5804	<i>Geotrichum candidum</i> CBS 178.53	<i>Candida rugosa</i> CBS 613	<i>Candida lipolytica</i> YB423.12
MB						
pH 6,5		3 h 30	7 h	3 h	3 h 30	3 h
MB + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$						
pH 6,5		3 h	2 h 30	2 h 45	2 h 15	2 h 30
MB						
pH 3,5		nc	nc	2 h 30	19 h	5 h 30
MB + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$						
pH 3,5		3 h	7 h	2 h 15	2 h 30	5 h
MM						
pH 6,5		3 h 30	2 h 30	4 h 30	3 h 15	2 h 30
MM						
pH 3,5		3 h 30	4 h	2 h 30	4 h	3 h 30
MM + oligo-éléments						
pH 6,5		3 h	3 h	4 h	2 h 15	3 h
MM + vitamines						
pH 6,5		4 h	2 h	2 h 30	3 h	3 h 30
MM + oligo-éléments						
+ vitamines pH 6,5		2 h	2 h 45	4 h	2 h 30	3 h
MM + oligo-éléments						
+ vitamines pH 3,5		3 h	4 h	2 h 45	3 h	3 h 15

• MB = milieu de base : pâte de neutralisation à 11,1 g.l⁻¹ (0,2 % de matière grasse finale) + H_2SO_4 pour réguler le pH. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,33 g.l⁻¹ final.

• MM = milieu minéral constitué de 11,1 g.l⁻¹ de pâte, soit 0,2 % de matière grasse.

• + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,165 g.l⁻¹,
• + $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ — 0,165 g.l⁻¹,
• + MgSO_4 — 0,068 g.l⁻¹.

TABLEAU II. — Rendements de croissance des souches cultivées sur pâtes de neutralisation.

Souches Rendements	<i>Candida curvata</i>	<i>Rhodotorula pilimanae</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Candida rugosa</i>	<i>Candida lipolytica</i>
Protéines	0,30	0,35	0,35	0,35	0,30
Matière sèche	0,85	0,90	0,90	0,80	0,80
Protéines/ Matière sèche	0,35	0,40	0,40	0,45	0,40

TABLEAU III. — Composition centésimale en acides aminés des levures cultivées sur pâtes de neutralisation (milieu minéral).

Souches	Acides aminés	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val	Met	iLeu	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Trp
<i>Rhodotorula pilimanae</i> CBS 5804		8,8	5	5,4	11,4	4,6	5,1	7,7	1,6	5,2	1,6	3,7	7,7	7,9	6,9	2,9	6	7,4	1,1
<i>Candida lipolytica</i> YB 423-12		10,3	6	6	10,9	4,3	4,9	6,4	1,3	5,3	1,3	4,2	6,7	11,5	6,4	2,0	6,5	5,1	0,9
<i>Candida curvata</i> CBS 570		9,8	5	5	11,3	4,6	5,5	9,4	1,3	5,5	1,3	4,3	7,7	7,1	4,5	2,2	7,0	7,4	1,1
<i>Geotrichum candidum</i> CBS 178-53		9,5	6,2	6	11,3	4,2	4,7	7,0	1,1	5,6	1,0	4,6	6,9	10,5	6,5	1,9	6,5	5,3	1,2
<i>Candida rugosa</i> CBS 613		9,8	6	5,7	11,4	4,3	4,8	7,5	1,6	5,5	0,9	4,2	6,7	8,0	5,1	2,3	8,7	5,9	1,6

TABLEAU IV. — Teneur des cellules en lipides totaux et composition centésimale en acides gras des levures cultivées sur pâtes de neutralisation.

	16	16 ⁻	18	18 ⁻	18 ⁼	18 ⁼	X	20	20 ⁻	22	24	Indice d'iode	Insaturés/ Ag totaux	Lipides totaux/ matière sèche
Pâtes	9,8	0,2	3,5	41,2	32,0	1,7	8,3	1	0,5	1	1		76	17,5
<i>R. pilimanae</i>	11	2,0	6,2	38,2	36,4	1,3	3,2	1	0,7	—	—	101	79	3,4
<i>C. curvata</i>	11	0,8	4,3	37,6	34	1,6	10,5	0,3	—	—	—	96	74	7,7
<i>C. lipolytica</i>	11,3	5,5	1,5	37,9	40,4	1,8	1,6	—	—	—	—	112	86	35,7
<i>G. candidum</i>	14,3	0,7	2,4	29	49,8	2,1	1,7	—	—	—	—	117	82	4,8
<i>C. rugosa</i>	6,8	1,0	2,3	56,6	29,3	2,0	1,5	0,2	—	—	—	105	89	8,3

TABLEAU V. — Teneur en éléments minéraux des levures cultivées sur pâtes de neutralisation (milieu minéral).
(Les teneurs sont exprimées en ppm sur les matières sèches).

Ions	Pâtes de neutralisation	<i>Candida curvata</i> CBS 570	<i>Rhodotorula pilimanae</i> CBS 5804	<i>Geotrichum candidum</i> CBS 178-53	<i>Candida rugosa</i> CBS 613	<i>Candida lipolytica</i> YB 423-12
P	15 200	15 000	8 900	14 800	26 200	27 700
K	1 600	9 500	8 300	10 600	13 400	9 700
Ca	2 600	1 000	440	340	1 300	400
Mg	1 200	2 000	1 300	2 450	1 200	4 600
Na	72 000	1 760	1 300	4 900	10 000	11 700
Cu	2,5	1	2,5	3	4	6
Mn	15	30	20	35	15	16
Zn	30	130	60	75	75	100
Fe	105	60	90	175	135	160

TABLEAU VI. — Teneurs (en %) des cellules en acides nucléiques exprimées en fonction de la matière sèche.

Levures	<i>Candida curvata</i>	<i>Rhodotorula pilimanae</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Candida rugosa</i>	<i>Candida lipolytica</i>
Acides nucléiques	6	14	15	10	16

e) Composition des stérols des levures.

En ce qui concerne l'analyse des stérols de chaque insaponifiable, le tableau VII montre que l'on ne trouve pas de stérol particulier pour une exploitation éventuelle. En effet, tous les composés inconnus sont inférieurs à 2 %. Notons cependant que *C. lipolytica* est très riche en campestérol qui n'est pas rare dans la nature.

Ajoutons que le spectre des stérols, s'il est stable, pourrait venir s'ajouter à la carte d'identité taxonomique des levures.

Il est bon de préciser que les identifications ont été réalisées par comparaison des temps de rétention avec des étalons. Il faudra confirmer l'identité de chaque stérol par couplage CPG/SM si l'on souhaite une application taxonomique.

On notera en outre la présence de faibles quantités de cholestérol dans tous les cas mais ce point devra également être confirmé par couplage CPG/SM.

Les valeurs du tableau VII ont été déterminées par normalisation interne en considérant les coefficients de réponse des différents constituants comme égaux. D'autre part l'ergostérol a été cumulé avec le campestérol, excepté pour *C. rugosa*.

TABLEAU VII. — Comparaison de la composition centésimale des stérols des cinq levures et des pâtes de neutralisation.

Stérols	<i>Candida curvata</i> CBS 570	<i>Rhodotorula pilimanae</i> CBS 5804	<i>Geotrichum candidum</i> CBS 178-53	<i>Candida rugosa</i> CBS 613	<i>Candida lipolytica</i> YB 413-12	P.N.
Cholestérol	1,3	1,1	3,2	3,1	0,2	0,3
Brassicastérol	5,0	5,3	2,5	4,2	1,8	7,6
X ₁	1,1	0,4	3,0	3,2	1,8	0,1
24 Méthyl-cholestérol	0,3	0,1	7,2	6,5	3,7	—
Campestérol	21,2	16,2	47,9	21,4	64,2	20,2
				ergostérol		
				17,8		
Stigmastérol	6,3	7,3	5,8	5,4	3,7	9,5
X ₂	0,2	0,1	1,0	1,0	0,6	0,1
Δ 7 Campestérol	6,0	1,3	2,5	4,2	2,1	0,2
X ₃	—	—	—	10,1	0,3	0,1
— Sitostérol	49,7	53,3	20,0	17,2	18,1	55,0
Fucostérol	0,6	0,8	0,8	1,2	0,6	0,3
X ₄	2,6	1,7	1,3	0,7	0,6	3,5
Δ 7 Stigmastérol	3,3	8,1	2,1	0,3	0,6	1,2
X ₅	0,6	1,7	1,3	0,3	0,5	0,8
X ₆	0,2	—	0,3	1,0	0,1	—
X ₇	—	—	0,3	2,1	—	—
Δ 5 Avénastérol	1,4	2,6	0,6	0,4	0,5	1,1

CONCLUSION

Les souches testées appartenant à 5 espèces différentes donnent une bonne croissance sur pâtes de neutralisation avec comme seuls additifs le (NH₄)₂SO₄ comme source d'azote et l'acide sulfurique pour ajuster le pH. La croissance est bonne à pH 6,5 ; il est possible que la valeur de 3,5, proche du pH limite d'action des lipases, soit légèrement trop basse. Il est probable que le travail à pH 3,5 ou 4 ne sera réalisable qu'avec une très bonne régulation de pH et l'apport de quelques additifs pour faciliter la croissance.

Les rendements sont excellents et laissent espérer une exploitation industrielle intéressante.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BA A. (1982). — Valorisation des sous-produits de l'arachide. Thèse de Docteur Ingénieur ENSA, Montpellier.
- [2] BA A., RATOMAHENINA R., GRAILLE J. et GALZY P. (1981). — Etude de la croissance de quelques souches de levures sur les sous-produits du raffinage d'huile d'arachide. Essais de valorisation de pâtes de neutralisation. *Oléagineux*, **36**, N° 8-9, p. 439-445.
- [3] MARTINET F., BA A., RATOMAHENINA R., GRAILLE J. et GALZY P. (1982). — Utilisation de savons pour la production de levures aliments. *Oléagineux*, **37**, N° 4, p. 193-198.
- [4] MARTINET F., RATOMAHENINA R., GRAILLE J. et GALZY P. (1982). — Production of food yeast from the solid fraction of palm oil. *Biotechnol. Letters*, **4**, p. 9-12.
- [5] MONTET D., RATOMAHENINA R., BA A., PINA M., GRAILLE J. et GALZY P. (1983). — Production of single cell protein from vegetable oils. *J. Ferment. Technol.*, **61**, p. 417-420.
- [6] HOTTINGER H. H., RICHARDSON T., AMUNDSON CH., STUIBER D. (1974). — Utilisation of fish oil by *Candida lipolytica* and *Geotrichum candidum*. I. Basal Conditions. *J. Milk Food Technol.*, **37**, p. 463-468.
- [7] HOTTINGER H. H., RICHARDSON T., AMUNDSON CH., STUIBER D. (1974). — Utilisation of fish oil by *Candida lipolytica* and *Geotrichum candidum*. II. — Optimisation of conditions. *J. Milk Food Technol.*, **37**, p. 522-528.
- [8] GREEN J. H., PASKELL S. L., GOLDMINTZ D. (1976). — Lipolytic fermentation of stickwater by *Geotrichum candidum* and *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, p. 569-575.
- [9] STRICKLAND L. H. (1951). — The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reaction. *J. Gen. Microbiol.*, **5**, p. 698-702.
- [10] GROB K., GROB G., GROB K. Jr. (1977). — The baryum carbonate procedure for the preparation of glass capillary columns; further informations and developments. *Chromatographia*, **10**, p. 181-187.
- [11] WEIL J. H., BAKES J., BEFORT N., EBEL J. P. (1964). — Contribution à l'étude de RNA messenger de la levure. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **46**, p. 1073-1078.
- [12] BURTON K. (1956). — A study of condition and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.*, **62**, p. 315-320.
- [13] PRIVAT de GARILHE (1964). — *Les nucléases*. Hermann ed. Paris.

SUMMARY

Single cell protein production from industrial soapstocks.

D. MONTET, R. RATOMAHENINA, J. M. LABORBE, M. PINA, J. GRAILLE and P. GALZY, *Oléagineux*, 1985, **40**, N° 10, p. 505-509.

Soapstocks are a by-product of the chemical refining of fats and oils. Generally, they are used in the soap industry or as a source of fatty acids for oleochemicals. The bioconversion into single cell proteins for animal feed and edible yeasts for consumption is proposed. Screening of different yeasts has been carried out and 5 strains have been selected for their growth rate, their high yield and their high protein content. Some analytical characteristics of such yeasts are given.

RESUMEN

Producción de proteínas de organismos unicelulares a partir de pastas de neutralización de origen industrial.

D. MONTET, R. RATOMAHENINA, J. M. LABORBE, M. PINA, J. GRAILLE y P. GALZY, *Oléagineux*, 1985, **40**, N° 10, p. 505-509.

Los soapstocks son un subproducto de la refinación química de las grasas. Suelen emplearse en la industria de jabones o como fuente de ácidos grasos para la química de aceites. Se propone realizar su bioconversión en proteínas de organismos unicelulares para la alimentación animal y también la alimentación humana. Se hizo un cribado de diversas levaduras, seleccionándose 5 cepas por su velocidad de crecimiento, su alto rendimiento y su alto contenido de proteínas. Se indican algunas características analíticas de estas levaduras.

